

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

**SZABADALMI
LEÍRÁS**
SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

(21) A bejelentés száma: 1484/88
(22) A bejelentés napja: 1988. 03. 23.

(40) A közzététel napja: 1992. 09. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1995. 02. 28. SZKV 95/02

(11) Lajstromszám:

210 122 B

(51) Int. Cl.⁶

A 61 K 35/60
A 61 K 31/20
A 61 K 33/04
A 61 K 35/72

(72) Feltalálói:

A feltalálók nevük feltüntetésének mellőzését kérték,
(HU)

(73) Szabadalmaz:

BIOREX Kutató-Fejlesztő Kft., Budapest (HU)

(74) Képviselő:

S.B.G. & K. Budapesti Nemzetközi Szabadalmi
Iroda, Budapest

**(54) Eljárás a keringési rendszer és a szív tromboembolitikus állapotokra ható
gyógyászati készítmény előállítására**

(57) KIVONAT

A találmány a szívre és a keringési rendszer tromboembolitikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására vonatkozik. A találmány értelmében úgy járnak el, hogy 0,5-50 tömeg%-ban szeléntartalmú glicerin-úpusú mikroorganizmust, valamint 99,5-

0,5 tömeg% 18-24-szénatomos, legalább két ketős kötés tartalmazó egy vagy több telítetlen zsírsavat kívánt esetben adalékanyagokkal és antioxidánsal elegyítenek és ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítanak.

legelőbb két teltetlen kötést tartalmazó zsírsavakat vagy ezek származékait kivált esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vívből és/vagy hordozóanyagokkal és kivált esetben antioxidánsal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakítunk.

A tálmány szerinti eljárással célszerűen olyan készítményeket állítunk elő, melyek eikozapentaénsavat (EPA) és dokozahexaénsavat (DHA), valamint szelén-tartalmú élesztőt tartalmaznak.

A készítmény egyik komponensétől szolgáló C₁₈₋₂₄ ω-3 teltetlen zsírsavak alapanyagaként különböző tengeri és édesvízi halakból, így elsősorban makrélából, tőkehalból, heringből, szardíniából, tintahalból és busóból, továbbá e halak májából nyerhető olajok, például a tőkehal májából /csukamájolaj/ és cápa májolaj használatuk.

A halolajok az EPA-n és a DHA-n kívül nagy mennyiségben tartalmaznak teltett és kismértékben teltetlen zsírsavakat, valamint el nem szappanosítható komponenseket. Ezen alkotórészek elválasztása igen fontos, hiszen a halolajokból készített gyógyászati készítmények dózisának növelése érzékenyen emelheti a bevitel korlátját, valamint a vér triglicerid-szintjét. Emellett az el nem szappanosítható alkotórészek tartalmazhatnak szteroidokat, például koleszterint, D-vitamint /annak provitaminját/ és/vagy A-vitamint. A D- és az A-vitaminok az emberi szervezetben kumulálódnak, így az ilyen vitaminokat tartalmazó készítménnyel nem lehetne a kívánatos hatás eléréséhez szükséges tartós kezelést végezni. Ezért a halolajból elővett olajok a felsorolt alkotórészeket, így a teltett és kismértékben teltetlen zsírsavakat, az el nem szappanosítható alkotórészeket, mint például a koleszterint, az A- és D-vitamint. Így módon a halolajban az EPA és DHA együttes mennyisége 50% fölé eúál.

Mikroorganizmusként célszerűen olyan törzseket használnunk, amelyek humán szempontból nem toxikusak, és így emberi fogyasztásra alkalmasak. Erre a célra legmegfelelőbbek a biotechnológiában is széles körben alkalmazott törzsek, mint például a *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Pediococcus* sp., *Acetobacter* sp., *Streptococcus* sp., *Torula* sp., *Kluyveromyces* sp., *Candida* sp., *Brettanomyces* sp., *Brevibacterium* sp., *Saccharomyces* sp., *Torulopsis* sp., *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Oldidium* sp., *Rhodotorula* sp., *Trichospora* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Monascus* sp., *Aspergillus* sp. stb. törzsek fajtái.

A tálmány szerinti készítmény oxidációjának gátlására aktív tartósítószerként α-tokoferol (E-vitamin), glutatión vagy hagyományos antioxidánsokat, mint például butil-hidroxi-toluolt célszerű használni.

Vívből és hordozóanyagoként a gyógyszerkészítésben szokásos anyagokat, mint például laktózt, keményítőt vagy magnézium-szulfátot alkalmazhatunk.

A tálmány szerinti készítmény készítése során a károsító mellékhatásoktól való mentességet igazoljuk, mert a patkányon mikrozonális enzimrendszerekben használt dózis százszoros mennyiségénél sem tapasztalunk elváltozást. A készítménnyel történő kezelés szignifikáns módon csökkenti a kontrollhoz

viszonyítva a szervezetben felhalmozódó lipofuscin mennyiségét. A tálmány szerinti készítménnyel Wistar oéányon patkányokon végzett 6-hetes vizsgálatok alapján egyértelmű trombocita aggregáció gátlást tapasztalunk.

A készítmény optimális hatásos napi dózisa 175 kg-os átlagos testtömegre számolva 2 g. Az olaj-komponens átlagosan 22% EPA-t és 43% DHA-t tartalmaz. Az élesztőpor grammként átlagosan 40 µg szelént tartalmaz.

A tálmány szerinti készítmény főbb előnyei a következők:

1. Egyesíti az EPA és a DHA, valamint a szelén és az élesztő előnyös tulajdonságait.
2. Kiküszöböli az ismert halolajtartalmú készítmények azon káros hatásait, melyeket a teltett lipid komponensek, például szterinek, valamint az A- és D-vitamin tartalom okozhat.

3. Kiküszöböli a politeltetlen zsírsavak fogyasztása esetén fellépő „ceroid lipofuscinosis” lehetőséget.

4. A szelént természetes anyagként mikroorganizmusban, mint pl. baktériumban, gombában, élesztőben feldolgozva tartalmazza, speciális mikroorganizmussal együtt adagolt szelén jobban felszívódik, és kedvező hatást előnyösebben fejt ki.

5. A szerves szelén mikroorganizmusokban így elsősorban élesztőben ipari méretekben, fajlagosan negyven-százszorosan olcsón állítható elő.

6. Kedvező gyógyászati hatást fejt ki atopikus zavarok esetén, és ekcéma, asztma, allergiás tünetek, allergiás rhinitis és/vagy atopikus öszszefüggő zavarok, például migrén, Crohn-féle betegség, fekélyes colitis, otitis media, nefritikus szindróma, cukorbetegség preventív kezelésére is felhasználható. Különböző alkalmas a keringési rendszer zavará, annak apoplexiás megnyilvánulásai, trombo-embolikus állapotok, így agyvérzés, infarktus, fiataloknál Keshan-szindrómájának kezelésére, valamint a rendellenes állapotok kialakulásának megelőzésére.

40. A tálmány szerinti készítményhez alkalmazott ω-3 politeltetlen zsírsavakat az 1. példában leírtak szerint, a szelént dúsított mikroorganizmussal pedig a 2-6. példák szerint állíthatjuk elő. A 7-9. példák a tálmány szerinti gyógyászati készítmények előállítását szemléltetik.

1. példa:

24 kg makréla olajat 60 °C-on feloldunk 16 liter metanolban 50-60 °C közötti hőmérsékleten, keverés közben 8 kg 40%-os NaOH oldatot cspegettetünk hozzá, majd az elegyet 60 °C-on továbbá 45 percig keveretjük. Mindegy 60 °C hőmérsékleten 20 kg 15%-os sósavat adunk az oldathoz. A fázisokat elválasztjuk, majd a szerves fázist még 10 kg 15%-os sóssal, majd 100 liter forró csapvízzel semlegesítjük. Az így kialakult fázisokat ismét elválasztjuk. Az olajos fázishoz 100 liter acetont adunk, fellemelegítjük mindegy 45 °C-ra, és hozzáöntünk 30 liter vízben feloldott 3,8 kg LiOH·H₂O-t. Fél óra keverés után éjszakán át állni hagyjuk, majd leszűrjük, és az acetó-

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás a szív és a keringési rendszer tromboemboliikus állapotaira ható gyógyászati készítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy 0,5–50 tömeg%, előnyösen 5–35 tömeg%, célszerűen 15–25 tömeg% szelén-tartalmú élesztő-típusú mikroorganizmust, valamint 99,5–50 tömeg%, előnyösen 95–65 tömeg%, célszerűen 85–75 tömeg% 18–24 szénatoms, legalább két telítetlen kötést tartalmazó egy vagy több zsírsavat és/vagy ezek származékait kívánt

esetben a gyógyszerkészítésben szokásos vivő- és/vagy hordozóanyagokkal és kívánt esetben antioxidánsal önmagában ismert módon gyógyszerkészítménnyé alakfűjük.

5 2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként tengeri halak olajából extrahált zsírsavakat használunk.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy telítetlen zsírsavként 5,8,11,14,17-eikozapentaénsavat és 4,7,10,13,16,19-dokozahexaénsavat használunk.

nos szűrletet bepároljuk. Körülbelül 8 kg 15%-os só-savval megsavanyítjuk és hexánal háromszor kizárjuk, majd a hexános fázist bepároljuk. A tisztítási művelet során végig N_2 -atmoszférában dolgozunk. Így 6,4 kg tisztított halolaját nyerünk.

Az így tisztított makrélalaj 1 kg-ját 60 °C-on hozzácsépegtetjük 3 kg karbamid 9 liter metanollal készített oldatához. Az elegyet 2 órán át ezen a hőmérsékleten keverjük. Lehűlés után éjszaka át a műhűtőben -10 °C-on állni hagyjuk, majd leszűrjük, és a szűrletet bepároljuk. A bepárolt anyaghoz 2,5 liter 1:1 hígítási sósavat öntünk, és 15 percig keverjük. Hexánal kizárjuk, a hexános fázist vízzel semlegesre mossuk, Na_2SO_4 -tal szárítjuk, majd bepároljuk. Így 0,34 kg ω-3 telítetlen zsírsavat kapunk. Jódszám: 315; EPA-tartalma: 24%; DHA-tartalma: 42%.

2. példa:

5-literes üveg palackokba 2-2 l sterilizált maláta-kivonatos folyékony táptalajt öntünk, és glükózzal 13% dúsítjuk. 5 µg/ml nátrium-szelenitet teszünk hozzá, majd beoltjuk *Saccharomyces cerevisiae*-vel. Levegőtérítéssel 32 °C-on 72 óráig neveljük. A 48. órában újabb 5 µg/ml nátrium-szelenitet adunk a tenyészethez.

Szűrőn át a sejteket desztillált vízzel többször átmoszuk, majd 68–70 °C-on szárítjuk. Az anyagot mikronizáljuk, majd atomabszorpciós módszerrel meghatározzuk a Se-tartalmat. A kapott érték 300 µg/g.

3. példa:

500 ml-es Erlenmeyer-lombikokba 100 ml élesztő-kivonatos folyékony táptalajt töltünk steril körülmények között, majd 5 µg/ml mennyiségű Na-szelenitet teszünk bele, és beoltjuk *Aspergillus sojae* gombával. 28–30 °C-on rázgatjuk a tenyészeteket. A tenyésztés 3. napján újabb 5 µg/ml Na-szelenitet teszünk a kultúrába. 3 nap eltelté után a szárazanyagot kiszűrjük, mosuk, majd a 2. példa szerinti módon szárítjuk. Mikronizálás után a minta műszeresen meghatározott Se-tartalma 300 µg/g.

4. példa:

A 3. példával azonos módon alkalmazzuk a *Torulopsis utilis* nevű élesztőt. A tenyésztés során nyert mikrobaörmeg Se-tartalma 120 µg/g.

5. példa:

A 3. példa szerinti módon elkészített táptaloston *Streptococcus thermophilus*-t nevelünk 45 °C-on. A nevelési és kinyerési periódus után a mikroba-por Se-tartalma 420 µg/g.

6. példa:

A 3. példával azonos módon nevelünk *Lactobacillus mesenteroides* baktériumfajt. Ez esetben a táptalajt 1% glükózzal és 2% szőlőcukorral készítsük meg. A kapott baktérium 300 µg/g Se-t tartalmaz.

7. példa:

150 g 65%-os dúsított makrélalajhoz /EPA-tar-

lom: 24%. DHA-tartalma: 42% / 10 g Se-élesztőpor keverünk /Se-koncentráció: 260 µg/g élesztőpor). A keveréket homogenizáljuk. A homogenizátumot 0,1% E-vitaminnal tartósítjuk. A kapott hatóanyagot légy zselatin gyöngykapuszulába vagy légy zselatin kapszulába töltjük, és buborék-csomagolással szerezjük ki.

8. példa:

Mindenben a 7. példa szerint járunk el, azzal az eljárással, hogy az alábbi kiindulási anyagokat használjuk: 400 g 65%-os dúsított tőkehal-májolaj, melynek EPA tartalma 22%, DHA-tartalma 43%; 100 g élesztőpor 120 µg/g Se-tartalommal és 0,4 mg E-vitamin. A homogenizátumot 500 mg hatóanyag befogadására alkalmas kapszulába töltjük.

9. példa:

Ismert gyógyszerészeti eszközökkel és eljárással az alábbi összetételű tablettákat állítjuk elő:

EPA-ra és DHA-ra néve dúsított tőkehal-májolaj, mely 0,1% E-vitamin-tartalommal tartalmaz (DHA-tartalma: 43%, EPA-tartalma: 22%)	200,0 mg
Nátrium-szelenit (Se-koncentráció: 150 µg/g élesztőpor)	86,0 mg
Laktóz	140,0 mg
Keményítő	60,0 mg
Polivinil-pirrolidon	3,5 mg
Magnézium-sztearát	3,5 mg

Kívánt esetben a tablettákat drasztikusan gépen csukorral vagy más anyaggal vonjuk be.

A trombocita aggregáció gátló hatást Wistar albino nőstény patkányok 10-es csoportjain 6 hetes p. o. kezeléssel vizsgáljuk. Az állatok I. csoportja 67% zsírsav-szármarék és 33% élesztő (Se-tartalma: 240 µg/g) keverékét, a II. csoport 94% zsírsav-szármarék és 6% élesztő (Se-tartalma: 240 µg/g), a III. csoport 50% zsírsav-szármarék és 50% élesztő (Se-tartalma: 240 µg/g) keverékét kapta. A IV. (kontroll) csoport 67% fiziológiai sóoldat és 33% élesztő (szelén-mentes) keverékét kapta.

A 6 hetes kezelést követően a vena cava inferiorból vért veszünk, a vérmintákat 3,5%-os Na-citrátal összekeverjük, centrifugáljuk és a kapott, trombocita-dús plazmában, ADP különböző koncentrációval trombocita aggregációt idéztünk elő. Az a minimális ADP-koncentráció, melynél az aggregáció jelentkezik, ADP különböző-koncentrációknak nevezzük. Ennek átlagos értéke (\bar{X}) a kontroll-csoportban 11,1 µ; a találmány szerinti kombináció hatására ez jelentősen emelkedik, mint azt az alábbi táblázat mutatja:

	\bar{X} (µM)
I. csoport	64,5
II. csoport	52,3
III. csoport	88,5

Az I. csoportú csoport.

A trombocita aggregáció gátló hatás jelentős, és 50–94% zsírsavat (vagy zsírsav-szármarékot) és 33–50% élesztőt (Se-tartalmú élesztőt) tartalmazó kombináció esetében megfelelően bizonyított.